

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :

2 791 685

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

99 04039

⑤① Int Cl⁷ : C 07 K 14/445, C 12 N 15/30, 15/85, 5/10, C 07 K 16/
20, C 07 H 21/00, A 61 K 48/00, 38/17, 39/015, 39/395, A 61 P
33/06

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 31.03.99.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 06.10.00 Bulletin 00/40.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT PASTEUR — FR et CEN-
TRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
CNRS — FR.

⑦② Inventeur(s) : BARALE JEAN CHRISTOPHE,
LANGSLEY GORDON, BRAUN BRETON
CATHERINE, PEREIRA DA SILVA LUIZ et BLISNICK
THIERRY.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

⑤④ NOUVEAU POLYPEPTIDE A ACTIVITE DE TYPE SERINE-PROTEASE PRODUIT PAR P. FALCIPARUM.

⑤⑦ Cette invention concerne un polypeptide isolé, dé-
nommé Pf-SUB2 produit par Plasmodium falciparum, ayant
une activité de type sérine-protéase comprenant la séquen-
ce d'acides aminés SEQ ID n° 3 ou la séquence SEQ ID n°
4 ou toute séquence d'acides aminés homologue.

FR 2 791 685 - A1



BEST AVAILABLE COPY

La présente invention concerne un nouveau polypeptide à activité de type sérine-protéase produit par *Plasmodium falciparum*, et son utilisation comme outil thérapeutique pour la prévention et le traitement d'une infection par *Plasmodium falciparum*.

5 Le paludisme reste l'une des principales maladies parasitaires de l'Homme, en particulier dans les régions tropicales. La plupart des cas mortels sont dus à *Plasmodium falciparum*, l'une des quatre espèces de *Plasmodia* infectant l'Homme. La propagation de parasites résistant à l'action combinée de plusieurs médicaments et de moustiques résistant aux insecticides conduit à
10 des difficultés majeures dans le contrôle et le traitement du paludisme. Pour cette raison, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques essentielles au développement du parasite est une première étape importante pour le développement de nouvelles thérapies anti-paludiques ou malariques.

L'invasion des érythrocytes est la phase initiale du cycle asexué
15 intra-érythrocytaire qui est responsable de tous les symptômes connus du paludisme. Les études de microscopie électronique et de microvideo montrent que l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes est un procédé rapide à plusieurs étapes, débutant par l'adhérence du mérozoïte à la surface cellulaire suivie par sa réorientation et son entrée dans la cellule hôte. Cette dernière
20 étape est concomitante avec la libération du contenu de trois organelles du mérozoïte (les rhoptries, les micronèmes et les granules denses) et peut être bloquée par des anticorps dirigés contre des protéines du mérozoïte ou des inhibiteurs de sérine-protéase.

L'une des étapes les mieux décrites affectées par des inhibiteurs
25 de sérine-protéase est la dernière étape de maturation de la protéine majeure de surface du mérozoïte (MSP1), un candidat vaccinal prometteur. MSP1 est synthétisée sous forme d'un précurseur de 200 kDa qui est protéolysé en deux étapes successives. La seconde affecte le polypeptide C-terminal à ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) (MSP1-42) dont le clivage produit les
30 polypeptides MSP1-33 et MSP1-19. Cette étape est réalisée par une sérine-protéase calcium-dépendante liée à la membrane du parasite et son inhibition par des inhibiteurs de sérine-protéase ou par des anticorps interrompt l'entrée des mérozoïtes dans les globules rouges.

Dans les cellules eucaryotes, la maturation de précurseurs polypeptidiques est un processus conservé habituellement réalisé par des sérine-protéases calcium-dépendantes de la famille des subtilases, les protéines-convertases (PC).

5 Parmi d'autres fonctions, les PC sont impliquées dans la maturation de toxines bactériennes et de glyco-protéines de surface rétrovirales. Partant du fait que la seconde étape de maturation de MSP1 est réalisée par une sérine-protéase calcium-dépendante, les inventeurs ont formulé l'hypothèse que *P. falciparum* synthétisait une protéase de type
10 subtilisine impliquée dans la protéolyse de MSP1-42. Leurs travaux ont abouti à l'identification d'un gène de *P. falciparum* (dénommé *Pf-sub2* (pour *P. falciparum*-Subtilisin Like Protease 2)) qui spécifie une sérine-protéase similaire à Pf-SUB1 récemment décrite (Blackman et al, 1998).

 De manière intéressante, bien que *P. falciparum* soit un
15 organisme eucaryote, le site actif de Pf-SUB2 est hautement similaire à celui des subtilisines procaryotes. En effet, des analyses phylogénétiques du site actif de Pf-SUB2 comparé aux protéases du type subtilisine d'eubactéries, plantes, levures ou organismes eucaryotes supérieurs suggèrent que Pf-SUB2 définit une nouvelle sous-classe de subtilases comprenant Pf-SUB1, la sérine-
20 protéase tagB de *Dictyostelium discoideum* et la maturase de mammifère récemment décrite S1P/SKI-1 (Sakai et al, 1998 ; Shaulsky et al, 1995). Le gène *Pf-sub2* est transcrit pendant la phase de différenciation du mérozoïte et produit une protéine précurseur intégrale de membrane, la forme mature de Pf-SUB2 étant sécrétée dans les granules denses. La caractérisation de Pf-SUB2
25 suggère que cette enzyme est impliquée dans l'étape de maturation de MSP1-42 et est ainsi une enzyme cruciale pour l'entrée du parasite dans les érythrocytes.

 La présente invention a donc pour objet un polypeptide isolé de
30 *Plasmodium falciparum* ayant une activité protéasique de type subtilisine comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID n° 3 (correspondant à la protéine totale) ou SEQ ID n° 4 (correspondant à la protéine sécrétée) ou toute séquence d'acide aminés homologue de celle-ci.

Par "séquence d'acides aminés homologue", on entend une séquence d'acides aminés qui diffère de la séquence d'acides aminés représentée à la séquence SEQ ID n° 3 ou n° 4 ou codée par une molécule d'ADN selon l'invention, uniquement par substitution, délétion et/ou insertion
5 d'un acide aminé ou d'un nombre réduit d'acides aminés, à des positions telles que ces modifications ne portent pas significativement atteinte à l'activité biologique du polypeptide ou à ses propriétés immunologiques.

Par "activité biologique du polypeptide", on entend son activité protéasique de type sérine-protéase, en particulier son aptitude à reconnaître
10 et cliver le polypeptide parasitaire MSP1-42.

L'activité biologique finale peut être celle obtenue après maturation du polypeptide par auto-clivage de la pro-protéine pour aboutir à la forme enzymatique active (par auto-activation).

Par "propriétés immunologiques" du polypeptide, on entend son aptitude à être reconnu par des anticorps spécifiques du polypeptide Pf-SUB2.
15

Lesdites substitutions sont de préférence des substitutions conservatives, c'est-à-dire des substitutions d'acides aminés de même classe, tels que des substitutions d'acides aminés aux chaînes latérales non chargées (tels que l'asparagine, la glutamine, la serine, la thréonine, et la tyrosine),
20 d'acides aminés aux chaînes latérales basiques (tels que la lysine, l'arginine, et l'histidine), d'acides aminés aux chaînes latérales acides (tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique) ; d'acides aminés aux chaînes latérales apolaires (tels que la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane, et la cystéine).

De préférence, une telle séquence d'acides aminés homologue est identique à au moins 85 % des séquences SEQ ID n° 3 ou n° 4, de préférence au moins 95 %.
25

L'homologie est généralement déterminée en utilisant un logiciel d'analyse de séquence (par exemple, Sequence Analysis Software Package of
30 the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). L'alignement des séquences étudiées permet de déterminer leur pourcentage d'identité et de similarité, qui est défini par l'enregistrement de toutes les positions pour lesquelles les acides

aminés des deux séquences comparées sont identiques, par rapport au nombre total de positions. A cette fin, il est nécessaire d'introduire de manière artificielle des espaces("gaps") dans les séquences.

Les polypeptides de la présente invention peuvent être synthétisés par toutes les méthodes bien connues de l'homme du métier, y compris les techniques d'ADN recombinant. Les polypeptides de l'invention peuvent également être synthétisés par les techniques de la chimie de synthèse, telles que la synthèse de type Merrifield qui est avantageuse pour des raisons de pureté, de spécificité antigénique, d'absence de produits secondaires non désirés et pour sa facilité de production.

La présente invention a également pour objet un acide nucléique isolé ayant une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide à activité sérine-protéase de type subtilisine de *Plasmodium falciparum*, tel que défini ci-dessus. Lesdits acides nucléiques de l'invention comprennent de préférence une séquence nucléotidique SEQ ID n° 1 (ADNc) ou une séquence nucléotidique SEQ ID n° 2 (ADN génomique) ou toutes séquences nucléotidiques homologues de celles-ci.

Par "séquence nucléotidique homologue", on entend une séquence qui diffère de la séquence SEQ ID n° 1 ou de la séquence SEQ ID n° 2 par substitution, délétion, et/ou insertion d'un nucléotide ou d'un nombre réduit de nucléotides, à des positions telles que cette séquence nucléotidique homologue spécifie un polypeptide homologue tel que défini précédemment.

De préférence, une telle séquence nucléotidique homologue est identique à au moins 75 % de la séquence SEQ ID n°1 ou de la séquence SEQ ID n° 2, de préférence encore au moins 85 %.

De manière préférentielle, une telle séquence nucléotidique homologue hybride spécifiquement aux séquences complémentaires de la séquence SEQ ID n° 1 ou de la séquence SEQ ID n° 2, dans des conditions stringentes. Les paramètres définissant les conditions de stringence dépendent de la température à laquelle 50% des brins appariés se séparent (T_m).

Pour les séquences comprenant plus de 30 bases, T_m est définie par la relation : $T_m = 81,5 + 0,41(\%G+C) + 16,6 \log(\text{concentration en cations}) - 0,63(\%\text{formamide}) - (600/\text{nombre de bases})$ (Sambrook et al, Molecular

Cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989, pages 9.54-9.62).

Pour les séquences de longueur inférieure à 30 bases, T_m est définie par la relation : $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.

5 Dans des conditions de stringence appropriées, auxquelles les séquences aspécifiques n'hybrident pas, la température d'hybridation est approximativement de 5 à 30°C, de préférence de 5 à 10°C en dessous de T_m , et les tampons d'hybridation utilisés sont de préférence des solutions de force ionique élevée telle qu'une solution 6xSSC par exemple.

10 Les différentes séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences d'ADN ou d'ARN, obtenues par criblage de banques de séquences au moyen de sondes élaborées sur la base de la séquence SEQ ID n°1 ou de la séquence SEQ ID n°2. De telles banques peuvent être préparées par des techniques classiques
15 de biologie moléculaire, connues de l'homme de l'art.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage des banques.

20 Ces séquences nucléotidiques permettent la réalisation de sondes nucléotidiques, hybridant spécifiquement avec la séquence SEQ ID n°1 ou la séquence SEQ ID n° 2 selon l'invention. Les conditions d'hybridation appropriées correspondent aux conditions de température et de force ionique usuellement utilisées par l'homme du métier, de préférence dans des
25 conditions stringentes telles que définies précédemment. De telles sondes font également partie de l'invention. Elles peuvent être utilisées comme outil de diagnostic *in vitro* pour la détection, par des expériences d'hybridation, notamment d'hybridation "*in situ*", d'une infection par *P. falciparum*.

30 Les sondes de l'invention comportent au minimum 10 nucléotides, et de préférence au moins 14 nucléotides, préférentiellement au moins 20 nucléotides, préférentiellement encore au moins 50 nucléotides, et au maximum comportent la totalité de la séquence nucléotidique SEQ ID n°1 ou de la séquence SEQ ID n° 2 ou de ses brins complémentaires.

Préférentiellement, les sondes de l'invention sont marquées, préalablement à leur utilisation. Pour cela, plusieurs techniques sont à la portée de l'homme du métier comme par exemple le marquage fluorescent, radioactif, chimioluminescent ou enzymatique.

5

Les séquences nucléotidiques de l'invention sont également utiles pour la fabrication et l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques sens et/ou antisens pour des réactions de séquençage ou d'amplification spécifique selon la technique dite de PCR (réaction de polymérisation en chaîne) ou toute autre
10 variante de celle-ci.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention ont par ailleurs des utilisations dans le domaine thérapeutique, pour la réalisation de séquences antisens, capables de s'hybrider spécifiquement avec une séquence d'acide nucléique, y compris un ARN messager. L'invention a ainsi
15 pour objet des séquences antisens capables d'inhiber, au moins partiellement, la production de polypeptides à activité de sérine-protéase de type subtilisine, tels que définis précédemment. De telles séquences sont avantageusement constituées par celles qui constituent le cadre de lecture codant pour les polypeptides à activité de sérine-protéase de type subtilisine au niveau du
20 transcrit.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent par ailleurs être utilisées pour la production de polypeptides recombinants ayant une activité de sérine-protéase de type subtilisine tels que précédemment
25 définis.

Ces polypeptides peuvent être produits à partir des séquences nucléotidiques définies ci-dessus, selon des techniques de production de produits recombinants connues de l'homme du métier.

30

Selon un mode de réalisation de l'invention, la séquence nucléotidique peut être insérée dans un vecteur d'expression, dans lequel elle est liée de manière opérante à des éléments permettant la régulation de son

expression, tels que notamment des promoteurs et/ou terminateurs de transcription.

5 Les signaux contrôlant l'expression des séquences nucléotidiques (promoteurs, activateurs, séquences de terminaison...) sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple l'électroporation ou la précipitation au phosphate de calcium.

10 Les vecteurs de clonage et/ou d'expression tels que décrits ci-dessus, contenant une des séquences nucléotidiques définies selon l'invention font également partie de la présente invention. Des exemples de vecteurs d'expression sont pRSET T7 (dans *E.coli*), pYES 2 (dans la levure) et DES (dans les baculovirus).

20 L'invention vise en outre les cellules hôtes transfectées, de manière transitoire ou stable, par ces vecteurs d'expression. Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes, procaryotes ou eucaryotes, d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réplication et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

25 Des exemples de cellules hôtes incluent notamment des cellules de mammifères, telles que les cellules COS-7 et CHO, des cellules du système nerveux telles que les cellules MSC80 et C6, des cellules d'insectes telles que les cellules SF9 infectées par des baculovirus recombinants, des bactéries telles que *E. coli* et des souches de levures telles que L40.

30 Les cellules hôtes selon l'invention sont utilisables dans un procédé de production d'un polypeptide à activité de sérine-protéase de type subtilisine, procédé dans lequel on cultive des cellules transfectées selon

l'invention dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide purifiable ayant une activité de sérine-protéase de type subtilisine comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID n°3 ou n°4, ou toute séquence d'acides aminés homologue de celle-ci et que l'on récupère ledit polypeptide que l'on purifie.

Les polypeptides peuvent également être produits en utilisant des systèmes d'expression *in vitro* comme le lysat de réticulocytes (GIBCO).

Les procédés de purification utilisés sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant obtenu peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps mono- ou polyclonaux spécifiques, etc.

L'invention a également pour objet des anticorps poly- ou monoclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués. Ces anticorps ou fragments sont caractérisés en ce qu'ils sont obtenus à partir d'un polypeptide tel que défini précédemment, administré à un animal, et sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide à activité de sérine-protéase de type subtilisine selon l'invention.

Des anticorps polyclonaux peuvent être obtenus à partir du sérum d'un animal immunisé contre un polypeptide à activité de sérine-protéase de type subtilisine selon l'invention selon les modes opératoires usuels.

Selon un mode de réalisation de l'invention, on peut utiliser comme antigène un fragment peptidique approprié, pouvant être couplé par l'intermédiaire d'un résidu réactif à une protéine ou un autre peptide, portant un épitope T-dépendant. Des lapins sont immunisés avec l'équivalent de 1mg de l'antigène peptidique selon la procédure décrite par Benoit et al, PNAS USA, 79, 917-921 (1982). A des intervalles de quatre semaines, les animaux sont traités par des injections de 200 µg d'antigène et saignés 10 à 14 jours plus tard. Après la troisième injection, l'anti-sérum est examiné pour déterminer sa capacité à se lier au peptide antigène radiomarké à l'iode, préparé par la méthode à la chloramine-T et est ensuite purifié par une chromatographie sur

colonne échangeuse d'ion carboxyméthyl cellulose (CMC). Les molécules d'anticorps sont ensuite recueillies dans les mammifères et isolées jusqu'à la concentration souhaitée par les méthodes bien connues de l'homme de l'art, par exemple, en utilisant DEAE Sephadex pour obtenir la fraction IgG.

5 Afin d'augmenter la spécificité du sérum polyclonal, les anticorps peuvent être purifiés par une chromatographie d'immuno-affinité en utilisant des polypeptides immunisants en phase solide. L'anticorps est mis en contact avec le polypeptide immunisant en phase solide pendant une durée suffisante de façon à faire immuno-réagir le polypeptide avec la molécule d'anticorps afin
10 de former un complexe immunologique en phase solide.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus selon la méthode classique de culture d'hybridomes décrite par Köhler et Milstein (Nature, (1975), vol 256, pp 495-497).

15 Les anticorps ou fragments d'anticorps de l'invention sont par exemple des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab et F(ab')₂. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués. Par exemple, ils peuvent être associés à une toxine, telle la toxine diphtérique ou à un produit radioactif.

20 Les anticorps de l'invention, en particulier les anticorps monoclonaux, tout particulièrement les anticorps dirigés contre le site actif de Pf-SUB2 peuvent être utilisés comme outils diagnostiques pour détecter une infection à *P. falciparum* ou thérapeutiques pour bloquer l'activité de Pf-SUB2 et enrayer l'invasion par *Plasmodium falciparum* des globules rouges de l'hôte.

25 L'invention a également pour objet une composition diagnostique comprenant un acide nucléique, un polypeptide ou un anticorps tel que défini ci-dessus.

30 La composition peut comprendre un acide nucléique, utile comme sonde ou amorce spécifique pour détecter après amplification, un acide nucléique de *P. falciparum* appartenant au gène *Pf-sub2*.

La composition peut également comprendre un polypeptide utile pour la détection par un test classique notamment de type ELISA d'un

anticorps spécifique de Pf-SUB2 présent dans un échantillon biologique d'un hôte infesté par *P. falciparum*.

La composition peut également comprendre un anticorps utile pour la détection d'une séquence peptidique antigénique de Pf-SUB2 présent dans un échantillon biologique d'un hôte infesté par *P. falciparum*.

L'invention concerne également une méthode pour le diagnostic *in vitro* d'une infection par *P. falciparum* comprenant la mise en contact d'au moins un anticorps/peptide tels que définis précédemment, contenus dans un prélèvement biologique d'un hôte infesté par *P. falciparum* dans des conditions permettant la formation éventuelle de complexes immunologiques spécifiques entre une séquence peptidique de Pf-SUB2/anticorps tels que définis précédemment et le ou lesdits anticorps/peptides et la détection des complexes immunologiques spécifiques éventuellement formés.

L'invention a également pour objet un kit pour le diagnostic *in vitro* d'une infection par *P. falciparum* dans un prélèvement biologique comprenant :

- au moins un anticorps/séquence peptidique spécifique de Pf-SUB2, éventuellement fixé sur un support ;
- des moyens de révélation de la formation de complexes antigènes/anticorps spécifiques entre ladite séquence peptidique et ledit anticorps et/ou des moyens de quantification de ces complexes.

Les tests de liaison utilisés dans le cadre de la présente invention peuvent être réalisés selon des méthodes bien connues de l'homme du métier. On peut notamment marquer préalablement les composés susceptibles de se lier au polypeptide récepteur, qui peuvent être utilisés seuls ou en compétition avec d'autres composés non marqués.

Plus particulièrement, on peut réaliser par exemple des tests de liaison compétitifs, des tests de type ELISA ou IRMA.

Dans le cadre de l'invention, on peut utiliser des moyens de marquage pour détecter le polypeptide récepteur selon l'invention, les anticorps dirigés contre ce récepteur et/ou les ligands de ce récepteur.

Les moyens de marquage utilisés peuvent être notamment un agent de marquage fluorescent qui se lie chimiquement à des anticorps ou à des antigènes sans dénaturation pour former un fluorochrome colorant qui est un indicateur immunofluorescent utile. L'agent de marquage peut aussi être
5 une enzyme, telle que la peroxydase (HRP) ou la glucose oxydase. Des éléments radioactifs peuvent être également utilisés comme agents de marquage.

L'invention a aussi pour objet un procédé de criblage de l'activité
10 protéase recombinante ou purifiée à partir d'une culture de Pf-SUB2, dans lequel on met en contact un milieu de culture susceptible de contenir Pf-SUB2 avec le substrat de Pf-SUB2, et on détermine l'activité enzymatique résultante par fluorescence ou par immuno-empreinte, la mesure de l'activité étant évaluée par le taux de dégradation du substrat.

15 L'invention a également pour objet un procédé de criblage de composés ayant une affinité biologique pour le polypeptide Pf-SUB2 ou un polypeptide homologue dans lequel on met en contact lesdits composés avec ledit polypeptide et on évalue le taux d'affinité entre lesdits composés et ledit
20 polypeptide.

Le procédé de criblage est particulièrement utile pour le criblage d'inhibiteurs de Pf-SUB2, et peut consister à mettre en contact le polypeptide Pf-SUB2 ou un fragment actif de celui-ci avec des composés potentiellement
25 inhibiteurs en présence d'un substrat du polypeptide, et à évaluer le taux d'inhibition du polypeptide Pf-SUB2 par les composés potentiellement inhibiteurs.

Comme substrat, on utilise avantageusement un peptide fluorogénique dont la séquence correspond au substrat MSP1-42.

30 L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant une molécule inhibant l'activité du polypeptide Pf-

SUB2 obtenue par un procédé de criblage tel que défini précédemment, la molécule étant avantageusement un inhibiteur enzymatique de Pf-SUB2.

La maturation de MSP1-42 à la surface du mérozoïte ayant lieu dans la circulation sanguine, c'est-à-dire dans un environnement riche en inhibiteurs de protéases impliqués entre autres dans la régulation de la coagulation et de la cascade d'activation du complément, l'enzyme parasitaire responsable de cette maturation (Pf-SUB2) n'est *a priori* pas sensible aux molécules de l'hôte à activité d'inhibiteurs de protéase. Les inhibiteurs obtenus par un procédé de criblage tels que définis ci-dessus n'ayant aucun effet sur les enzymes de l'hôte sont donc particulièrement intéressants comme agents thérapeutiques ayant une activité spécifique sur la prolifération de *P. falciparum*. Les molécules criblées par un procédé tel que décrit précédemment sont utiles en particulier pour la fabrication d'un médicament destiné à prévenir et/ou traiter une infection à *Plasmodium falciparum*, et constituent un autre objet de l'invention.

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant un anticorps spécifiquement dirigé contre Pf-SUB2.

L'invention a en outre pour objet une composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique ou un fragment d'acide nucléique codant pour un polypeptide selon l'invention ou capable de s'hybrider avec un acide nucléique ADN ou ARN codant pour tout ou partie du polypeptide Pf-SUB2.

Un tel fragment d'acide nucléique peut comme évoqué précédemment être un oligonucléotide antisens capable d'inhiber la transcription ou la traduction de Pf-SUB2.

Un tel acide nucléique peut également être un acide nucléique spécifiant un polypeptide selon l'invention utile comme agent vaccinal.

L'invention a donc également pour objet une composition vaccinale contre une infection à *Plasmodium falciparum* comprenant à titre d'antigène tout ou partie du polypeptide Pf-SUB2 ou tout ou partie de l'acide nucléique codant pour le polypeptide Pf-SUB2 sous sa forme mature ou sa forme exprimée, susceptible de fournir des anticorps neutralisants.

Selon le cas, le polypeptide, l'acide nucléique ou l'anticorps est associé à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Les modes d'administration, les posologies et les formes galéniques des compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être
5 déterminés de manière usuelle par l'homme du métier, notamment selon les critères généralement pris en compte pour l'établissement d'un traitement thérapeutique adapté à un patient, comme par exemple l'âge ou le poids corporel du patient, la gravité de son état général, la tolérance au traitement, et les effets secondaires constatés, etc.

10

Les exemples et figures dont les légendes suivent illustrent l'invention sans la limiter :

LEGENDE DES FIGURES

15

- La figure 1a) représente la séquence nucléotidique et protéique de la protéase 2 de type subtilisine de *Plasmodium falciparum*. Les 4611 nucléotides (n° accès AJ 132006) correspondant à la séquence d'ADNc du gène de *Pf-sub2* est représentée. La séquence de l'intron (143 pb) est
20 représentée en italiques et les extrémités conservées **GT/AG** sont en gras. Les codons d'initiation et de fin de traduction prédits sont en caractères gras et soulignés. La séquence de la protéine Pf-SUB2 commence par un peptide signal représenté en caractères gras. Les quatre résidus proposés pour le site actif subtilase, à savoir Asp⁷⁵⁰, His⁷⁹³, Asn⁸⁷⁸ et Ser⁹⁵⁶ sont encadrés et le
25 segment transmembranaire de l'extrémité C-terminale est souligné par un double trait. Entre parenthèses, sont définis les 259 résidus du domaine catalytique utilisés pour réaliser l'alignement en arbre phylogénétique, tandis que la séquence correspondant à la protéine de fusion avec GST (Gluthanione S-transferase) est représentée en italiques et soulignée par un trait en
30 pointillés. Les deux sites d'activation (LN) sont soulignés.

- La figure 1b représente une séquence protéique prédite pour Pf-SUB2 et l'identification au domaine conservé du site actif de Pf-SUB2 par analogie avec celui de la subtilisine BPN (Bacilus Protéase NOVO (Acc. x

00165)) exprimé par *B-amyloquefaciens*. Les identités entre les deux sites actifs sont indiqués par - et la similarité des groupes est montrée par :. La flèche \uparrow indique l'interruption de la phase ouverte de lecture de l'intron.

- La figure 2 représente la localisation chromosomique du gène *Pf-sub2*. Des blocs de chromosomes obtenus à partir du clone 3D7 et de la souche Palo Alto de *P. falciparum* ont été préparés comme décrits par Hinterberg et al, (1994).

La sonde d'ADNc (1027 pb) correspondant au domaine catalytique de Pf-SUB2 s'hybride principalement aux chromosomes 1 et 11 dans des conditions de lavage à faible stringence (2X SSC/0,1 % SDS). Cependant, après lavage à 0,5X SSC/0,1 % SDS, la même sonde s'hybride au chromosome 11 uniquement.

- La figure 3 représente l'analyse en arbre phylogénétique basée sur l'alignement des séquences des domaines catalytiques de 32 subtilases provenant d'organismes variés. L'alignement original a été réalisé en utilisant le programme Clustal W 1,7 (Thompson et al, 1994) et la matrice de distance a été déterminée en utilisant le programme PROTDIST (Felsenstein et al, 1993). Un dendogramme sans racine a ensuite été construit en utilisant la méthode "neighbor-joining" du programme NEIGHBOR, et le logiciel DRAWTREE a produit l'arbre représenté à la figure 3 (Felsenstein et al, 1993). La plupart des sous-familles de subtilases connues sont représentées à partir de plantes, de bactéries et d'organismes eucaryotes inférieurs et supérieurs. Pf-SUB2 et Pf-SUB1 se différencient des subtilases eucaryotes connues et apparaissent avoir une similarité plus grande avec les enzymes bactériennes. Les subtilases eucaryotes les plus proches sont tagB de *D. discoideum* et S1P/SKI-1 humain, et définissent avec Pf-SUB2 et Pf-SUB1 une nouvelle sous-classe de subtilases eucaryotes.

- Les figures 4A et 4B représentent les résultats de l'analyse de l'expression de l'ARNm de *Pf-sub2* au cours du cycle asexué de *P. falciparum*. La RT-PCR a été réalisée sur de l'ARN total isolé entre 6 et 46 heures après l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes de *P. falciparum* (souche Palo Alto) cultivées *in vitro*.

Sur la figure 4 A, les oligonucléotides de *Pf-sub2* ont été choisis de manière à encadrer l'intron de *Pf-sub2*. Les tailles attendues des fragments amplifiés sont de 880 pb et 737 pb sur l'ADN génomique et l'ADNc respectivement.

5 Sur la figure 4B, la RT-PCR a été réalisée en utilisant deux oligonucléotides spécifiques de *Pf-rab6*, dans lequel un oligonucléotide chevauchait sur la jonction entre les deux premiers exons de *Pf-rab6*, de manière à ce que seul l'ADNc soit amplifié. Comme témoins négatifs, une RT-PCR a été réalisée sur l'eau.

10 - La figure 5 représente les résultats d'analyse en Western Blot d'extraits protéiques préparés à partir de schizontes et mérozoïtes segmentés de *P. falciparum*. Les couloirs 1 et 2 correspondent aux extraits protéiques solubles et insolubles dans Na_2CO_3 respectivement, préparés à partir des schizontes segmentés. Les couloirs 1' et 2' contiennent la même proportion
15 d'extraits protéiques solubles et insolubles dans Na_2CO_3 préparés à partir de globules rouges non infectés. Les couloirs 3-3' et 4-4' représentent les résultats d'analyse en Western Blot réalisés sur des protéines solubles et insolubles dans Na_2CO_3 extraites à partir de mérozoïtes libres. Les couloirs 1-2, 1'-2' et 3-4 ont été mis à incuber avec un antisérum dirigé contre la protéine de fusion
20 GST Pf-SUB2 tandis que les couloirs 3'-4' ont été mis à incuber avec un antisérum dirigé contre la protéine GST. Les couloirs 5 et 6 correspondent à l'immunoprécipitation de protéines marquées au S^{35} de schizontes segmentés réalisées avec des anticorps de souris anti-GST-Pf-SUB2 (protéine de fusion) et anti-GST.

25 - Les figures 6A, 6B et 6C représentent les résultats d'analyse de localisation de la protéine (Pf-SUB2) par immunofluorescence sur des schizontes segmentés et par immuno-microscopie électronique sur des mérozoïtes fixés.

30 Les clichés 6A et 6B montrent un schizonte segmenté fixé et séché à l'air, respectivement incubé avec 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'iodure de propidium qui marque le noyau du parasite (6A) et avec un antisérum de souris dirigé contre la protéine de fusion GST-Pf-SUB2 (6B). Les anticorps liés ont été détectés ultérieurement avec des anticorps anti-souris couplés à la FITC (isothiocyanate

de fluorescéine) (x 1500). Le cliché 6C représente l'analyse en immuno-
microscopie électronique de coupes fines de mérozoïtes incluses dans de la
résine et mises en présence d'un antisérum de souris dirigé contre la protéine
de fusion GST-Pf-SUB2 puis révélées avec des anticorps IgG anti-souris
5 marqués à l'or, M représentant les mitochondries.

- La figure 7 représente l'alignement de 22 résidus entourant le
site de maturation Leu \dagger Asn MSP1-42 avec les 38 résidus correspondant à la
région du site d'auto-activation prédit de Pf-SUB2. Les identités sont
représentées par des traits verticaux et les résidus du même groupe sont
10 représentées par des pointillés doubles.

- Les figures 8A à 8F représentent la modélisation du site
catalytique de Pf-SUB2 associé avec son substrat proposé MSP1-42 défini par
huit résidus (K-F-Q-D-M-L-N-I).

La modélisation est réalisée avec les programmes QUANTA et
15 CHARM (QUANTA® est un programme commercialisé par Molecular
Simulations Inc).

Le programme CHARM a fait l'objet d'une publication de Brooks
et al, 1983, en utilisant comme modèle la structure établie pour le complexe de
la subtilisine BPN et de son inhibiteur eglin (figures 8A et 8C), ainsi que le
20 complexe formé par la subtilisine Calsberg (*B.licheniformis*) elle-même
associée avec l'inhibiteur eglin C. Les aa différents pour Pf-SUB2 par rapport à
BPN ont été substitués et les insertions ont été modélisées à partir de la
banque de boucles peptidiques disponibles dans le programme QUANTA.

- La figure 8B représente la visualisation de la modélisation du
25 domaine cat. de Pf. SUB2 + MSPI-42.

- Les figures 8D, 8E et 8F représentent un agrandissement de la
figure 8B permettant de mieux visualiser le site actif de Pf. SUB2 interagissant
avec MSPI-42.

- Les figures 8D et 8E représentent les insertions qui apparaissent comme des boucles de surface distantes de la région liant le substrat avec la possible exception du segment précédent l'aa HIS 793 (incluant Arginine 789) qui pourrait influencer la structure des poches S_1' et S_2' .

5 Cette modélisation a été manuellement corrigée pour exclure tout lieu improbable. Cette modélisation a ainsi été modifiée dans le but de minimiser les niveaux d'énergie afin de stabiliser le modèle. Cette correction est réalisée à l'aide du programme CHARM.

EXEMPLES

MATERIELS ET METHODES

5

Les inventeurs sont partis d'un clone consistant en un ADNc de 2043 pb d'une EST (séquence partielle exprimée) de *P. falciparum* obtenu à partir de la collection de l'Université de Floride (code accès n° 97791 ; Chakrabarti et al, 1994) et l'ont séquencé sur un séquenceur "ABI DNA sequencer"®. Le cadre de lecture ouverte complet (ORF) a été obtenu en initiant des réactions de polymérase en chaîne (PCR) à l'aide de l'oligonucléotide K50 de séquence 5'AACGTCAAATGACTAGAGC3' combiné avec l'amorce universelle M13 sur la banque d'ADNc d'origine (Chakrabarti et al, 1994). Le fragment amplifié correspondant aux nucléotides 1554 à 2645 a été cloné en utilisant le kit de clonage TopoTA (Invitrogen) et séquencé en utilisant le kit de réaction Sequenase® (USB-Amersham). Ensuite, l'oligonucléotide K51 5'CGAATGAAGATCTAATTCTCC3' a été utilisé comme amorce pour une réaction de PCR asymétrique sur la banque vectorette d'ADN génomique *Dra1* de Palo Alto (Barale et al, 1997). Ceci a conduit aux nucléotides 648 à 1655. Enfin, une PCR réalisée sur la banque d'ADNc d'origine en utilisant l'oligonucléotide K53 5' TTTTGTTACTAGCCAAATTC3' et l'amorce universelle M13 a permis d'amplifier un fragment de 750 pb correspondant à l'extrémité 5' de la séquence d'ADNc de *Pf-sub2*. Chaque fragment amplifié a été séquencé en triple exemplaire pour éliminer les erreurs potentielles introduites par la PCR.

25

Electrophorèse sur gel en champs pulsés du blot chromosomique de Palo alto et de 3D7.

L'électrophorèse sur gel en champs pulsés a été réalisée comme décrit par Hinterberg et al (1994). La sonde d'ADNc Pf-SUB2 a été obtenue par RT-PCR en utilisant les oligonucléotides suivants : Khis 5'-TCCTACAGATGCTTAGGTC-3' et SUB1B, 5'-ATCGAATTCATACAAATTATATAAGGC-3'. Le fragment d'ADNc de 1027 pb a

30

été marqué par du α - ^{32}P par amorçage aléatoire (Megaprime, Amersham) et hybridé pendant 24 heures dans 6X SSC, 0,1 % SDS et 2,5 % de lait écrémé à 65°C, lavé à la même température pendant 30 minutes dans 2X SSC (1X SSC : 16,5 mM NaCl, 15 mM citrate de sodium, pH 7,0), 0,1 % SDS ou 0,5X SSC, 0,1 % SDS.

Analyse par ordinateur de Pf-SUB2 et construction de l'arbre phylogénétique

La prédiction du peptide signal de Pf-SUB2 et de son site de clivage a été réalisée en suivant la technique de Nielsen et al, (1997), tandis que le domaine de Pf-SUB2 est identifié en utilisant le programme de Rost et al, (1996). L'analyse phylogénétique des sites actifs de 32 protéases de type subtilisine a été réalisé comme décrit par Siezen et al, 1997, sauf que l'alignement multiple des séquences de 32 protéases de type subtilisine a été réalisé en utilisant le programme Clustal W 1,7 paramétré pour une faible pénalité d'insertion d'intervalles (Thompson et al, 1994). Les 259 résidus correspondants à la région totale du site actif de Pf-SUB2 ont été alignés contre les régions correspondantes des 31 autres séquences décrites par Siezen et al, (1997) ainsi qu'avec Pf-SUB1. L'alignement multiple a été utilisé pour déterminer la matrice de distance à l'aide du programme PRODIST (Felsenstein et al (1993). Un dendogramme sans racine a été construit en utilisant la méthode d'association par proximité de séquences ("Neighbor-joining") de NEIGHBOR et le logiciel DRAWTREE.

RT-PCR (PCR par transcriptase reverse) et identification de l'intron.

L'ARN total a été préparé en utilisant du trizol (GIBCO-BRL) et en suivant les instructions du fabricant. Dans le cas de l'analyse du transcrit *Pf-sub2*, les inventeurs ont utilisé les oligonucléotides KB

5'GCATCCGGAAATAAAAGTAAC3' et SUB1 décrit précédemment pour amplifier le fragment défini par les nucléotides 2713 et 3593. L'ARN correspondant à environ 10^6 parasites de chacun des différents compartiments sanguins a d'abord été incubé avec une DNase1 exempte de RNase (Mannheim, Boehringer). La synthèse du premier brin d'ADNc a été initiée par l'oligonucléotide SUB1B en présence de la transcriptase reverse Superscript-MMLV (GIBCO-BRL). Pour l'analyse par RT-PCR de *Pf-rab6*, les oligonucléotides Rab6.7 5' GAATTTCAAACTCGGGAC3' et Rab6.3 5'CCTGACCTGCAGTGTCC3' ont été utilisés pour amplifier un fragment d'ADNc de 203 pb (Alves de Castro et al, 1996). L'oligonucléotide Rab6.7 chevauche la jonction des exons 1 et 2 de *Pfrab6*. Un témoin négatif pour la RT-PCR a également été réalisé en utilisant en tant que matrice soit une quantité équivalente d'ARN non transcrit de façon inverse ou de l'eau. Les matrices pour les témoins positifs étaient l'ADN génomique de la souche Palo Alto pour *Pf-sub2* et un clone d'ADNc pour *Pf-rab6* (Alves de Castro et al, 1996). Pour cartographier précisément la jonction intron-exon, un fragment d'ADN génomique spécifique de *Pf-sub2* a été cloné et séquencé.

Analyse par Western Blot et immunoprécipitation de Pf-SUB2

Une protéine de fusion Gluthatione-S-Transferase-Pf-SUB2 (GST-Pf-SUB2) correspondant aux résidus 3661 à 4005 (figure 1) a été produite de la manière suivante : les oligonucléotides SUB2A-*Bam*H1 5' TATATGGATCCGCGTAAACATAGTGATAAG3' et SUB2B-*Eco*R1 5'GTAGAATTCTTTGGTCTCTTTCTTTC3' ont été utilisés pour amplifier un fragment de 351 pb à partir du clone d'ADNc original et après digestion par *Bam*H1 et *Eco*R1, il a été ligaturé dans le plasmide pGEX-A (Pharmacia). La protéine de fusion GST-Pf-SUB2 a été préparée comme décrit par Frangioni et al (1993) sauf que la protéine purifiée a été éluée des billes d'agarose gluthanion (Sigma) à l'aide d'un tampon salin phosphate 0,2 % SDS (PBS : 10 mM phosphate de potassium, 145 mM de NaCl, pH 7,4). Des souris CD1 ont d'abord été immunisées par voie sous-cutanée avec 20 µg de la protéine de fusion GST-Pf-SUB2 en présence d'adjuvant de Freund complet ; cinq

injections complémentaires ont été réalisées ultérieurement à l'aide de la même quantité d'antigènes en présence d'adjuvant de Freund incomplet. La même procédure a été suivie pour produire un sérum anti-GST. Des extraits protéiques ont été produits à partir de globules rouges synchrones infestés par la souche knob⁺ Uganda Palo Alto cultivée *in vitro* comme décrit par Trager et al, (1976). Des schizontes segmentés ont été enrichis par centrifugation sur un gradient Percoll-sorbitol et les mérozoïtes ont été préparés à partir de schizontes segmentés enrichis par flotation sur gélatine et laissés à maturation jusqu'à libération des mérozoïtes. Les globules rouges infestés et la quantité équivalente d'érythrocytes non infestés ont été rassemblés sous forme de culots et lysés dans un volume d'eau par traitement de congélation-décongélation. Les protéines sous forme de culot insoluble ont été ensuite extraites par un traitement avec Na₂CO₃ en milieu alcalin (100 mM), 30 minutes à 4°C, connu pour discriminer entre les protéines membranaires périphériques qui sont solubilisées (surnageant) et les protéines intégrales de membranes qui sont insolubles, et sédimentées par une centrifugation à 100 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Les extraits protéiques correspondant à approximativement 5.10⁶ globules rouges infestés ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 7,5 % SDS. Après transfert sur nitrocellulose, les analyses de Western Blot ont été réalisées comme décrit sauf que l'antisérum a été utilisé à une dilution de 1/100 (Barale et al, 1997). Les études d'immunoprécipitation ont été réalisées comme décrit par Mattei et al (1992) à l'aide de protéines de parasites extraites dans 1 % SDS, sauf que des parasites hautement synchrones ont été cultivés en présence de méthionine/cystéine (ICN) marquée au ³⁵S 175 mCi/ml pendant les sept dernières heures de la schizogonie.

Immunolocalisation de Pf-SUB2 par analyse par fluorescence indirecte (IFA) et microscopie électronique (IEM)

Des anticorps de souris anti-GST-Pf-SUB2 ou des anticorps de souris anti-GST, (tous deux dilués à 1:50) ont été incubés pendant 30 minutes

à 37°C avec des globules rouges infestés, probablement séchés à l'air, et enrichis par flotation sur gel. Des lamelles de microscopie ont alors été lavées à trois reprises pendant 10 minutes dans du PBS et mises à incuber avec des IgG et IgM de chèvre anti-souris conjugués à la fluorescéine (dilution 1:100), (Immunotèch) en présence d'iodure de propidium (25 µg/ml). Les lamelles ont ensuite été lavées dans du PBS, scellées en présence de p-phénylènediamine 0,1 % - glycérol 0,5 % en tant qu'agent stabilisant la fluorescence et ultérieurement analysées avec un microscope Leica avec un agrandissement de 1 500 fois sous lumière UV.

Pour la microscopie électronique, des parasites de *P. falciparum* (Palo Alto) ont été fixés pendant 30 minutes à 4°C avec du formaldéhyde 1 %, glutaraldéhyde 0,1 % dans un tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4. Les échantillons fixés ont été lavés, déshydratés et inclus dans une résine LR White (Polysciences, Inc. Warrington, PA) comme décrit par Aikawa et al, (1990). Des coupes fines ont été bloquées dans du PBS contenant 5 % (v/v) de lait écrémé déshydraté et 0,01 % (v/v) de Tween 20. Les grilles ont été incubées avec des anticorps primaires (anticorps anti-GST-Pf-SUB2 de souris ou anti-GST de souris) diluées de 1/50 à 1/200 dans du PBS contenant 1 % de sérum albumine bovine (p/v) et 0,01 % (v/v) de Tween 20 (PBT), pendant 2 heures à température ambiante. Des témoins négatifs comprenaient du sérum normal de souris et du PBT appliqué en tant qu'anticorps primaire. Après lavage, les grilles ont été incubées pendant une heure avec 15 nm d'IgG de chèvre anti-souris conjugués à l'or (Amersham) dilués au 1:20 dans du PBT, rincé avec du PBT et fixés avec du glutaldéhyde pour stabiliser les particules d'or. Des échantillons ont été colorés avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb, et examinés à l'aide d'un microscope électronique Zeiss CEM902.

Exemple 1 : Isolement et caractérisation du gène Pf-sub2 et caractérisation de la protéine correspondante

Les inventeurs ont identifié un fragment de séquence exprimée (EST) de *P. falciparum* dans la collection de l'Université de Floride possédant un cadre de lecture ouverte (ORF), présentant de fortes similarités avec le site

actif de subtilisines bactériennes. Ce clone débute au nucléotide 2669 de la séquence Pf-SUB2 complète et comprend une extrémité 3' non traduite (figure 1). En combinant les différentes techniques de PCR asymétriques décrites précédemment, ils ont obtenu le cadre de lecture ouverte complet de 4,3 kb de *P. falciparum*, dont la taille a été confirmée par digestion avec la nucléase de Mung Bean (Mc Cutchan et al, 1984).

La séquence d'acides aminés de 1337 résidus de Pf-SUB2 déduite correspond à un polypeptide théorique de 140 kDa (figure 1). Elle commence avec un signal peptidique de 21 résidus et possède un domaine transmembranaire hydrophobe putatif de 19 acides aminés, proche de l'extrémité C-terminale. Aucun motif GPI suggérant une addition post-traductionnelle n'a été détecté. Ces observations suggèrent que Pf-SUB2 est une protéine sécrétée et intégrale de membrane de type 1. Il est important de noter que Pf-SUB2 contient les quatre séquences consensus connues pour former le site actif des sérine-protéases de type subtilisine de la super-famille S8 (Rawlings et al, 1993 ; Siezen et al, 1997). La triade catalytique universellement conservée est composée de Asp⁷⁵⁰, His⁷⁹³ et Ser⁹⁵⁶, tandis que la cavité de l'oxyanion impliqué dans la stabilisation du couple enzyme-substrat met en oeuvre le résidu Asn⁸⁷⁸ (figure 1). De manière intéressante, les résidus Asn⁸⁷⁸ et Ser⁹⁵⁶ du site actif de Pf-SUB2 sont codés par des exons différents séparés par un intron de 143 pb (figure 1). Cet intron est défini par des extrémités conservées GT/AG, à une teneur A/T de 86,7 % tandis que le reste de la séquence codante est riche en résidus A/T (74,2 %).

Une sonde de 1027 pb correspondant au site actif de Pf-SUB2 s'hybride principalement aux chromosomes 1 et 11 (figure 2). En conditions plus stringentes, seul le chromosome 11 est identifié, ce qui implique que *Pf-sub2* est porté par ce chromosome. En accord avec la présence de gènes de la famille des "subtilisines-like" sur d'autres chromosomes, la région du site actif de 259 résidus de Pf-SUB2 présente une identité de 37 % et une similarité de 48 % par rapport à la région équivalente de la protéine Pf-SUB1 récemment décrite (Blackman et al, 1998). Il est intéressant de noter qu'à l'extérieur des

régions du site actif, les deux subtilisines parasites ne présentent pas de similarité significative.

L'analyse phylogénétique de la région du site actif de 259 résidus de Pf-SUB2 comparée à 31 sites actifs de type subtilisine exprimés par des organismes variés comprenant des eubactéries, plantes, levures et animaux eucaryotes supérieurs est représentée à la figure 3. De façon évidente, Pf-SUB2 s'apparente plutôt aux subtilases bactériennes qu'eucaryotes (figure 3). Elle présente 44 % de similarité avec le site actif de la subtiline de *Bacillus subtilis* et seulement 29 % de similarité avec celui de kex2 de *Saccharomyces cerevisiae*, 34 % avec celui d'ATSERP de *Arabidopsis thaliana* et 36 % avec celui de PC7 humain, la pro-protéine-convertase de mammifère la plus proche des protéases d'eucaryotes inférieures de type subtilisine (Seidah et al, 1996 ; Siezen et al, 1997). Parmi les subtilases eucaryotes, seul TAGB (36 %) de *Dictyostelium discoideum* et S1P/SKI-1 (35 %) de mammifère récemment décrite (Nagase et al, 1995 ; Sakai et al, 1998), présentent une proche parenté avec Pf-SUB2. L'analyse phylogénétique suggère que Pf-SUB2 et Pf-SUB1 appartiennent à la sous-famille des pyrolysine-subtilases, comme montré précédemment pour *Dd*-TAGB et S1P/SKI-1 (Siezen et al, 1997).

Le site actif de Pf-SUB2 présente les deux principales caractéristiques suivantes :

- 1) le site consensus de la sérine (GTS⁹⁵⁶MA) contient une méthionine qui est conservée dans toutes les subtilisines bactériennes, fongiques et de plantes, mais est absente dans les PC eucaryotes. Ce résidu méthionine est présent dans le site actif de *Dd*-TAGB tandis que S1P/SKI-1 possède une valine.

- 2) le site actif de Pf-SUB2 (D⁷⁵⁰SG) est identique aux subtilisines bactériennes, tandis que les PC ont un motif (DDG). Dans le cas du site actif de *Dd*-TAGB et S1P/SKI-1, le motif (DDG) apparenté aux plantes est retrouvé.

- Ces observations prises ensemble suggèrent fortement que Pf-SUB2 avec Pf-SUB1, *Dd*-TAGB et S1P/SKI-1 définissent une nouvelle sous-classe de subtilases de type pyrolysine eucaryotes similaires aux enzymes bactériennes et différentes des PC.

Exemple 2 : Transcription du gène *Pf-sub2* de *P. falciparum* et traduction de la protéine Pf-SUB2.

5

Une RT-PCR a été réalisée sur de l'ARN total préparé à partir d'anneaux, de trophozoïtes et de schizontes de *P. falciparum*. Des oligonucléotides spécifiques de *Pf-sub2* ont permis d'amplifier le fragment d'ADNc épissé de 737 pb attendues, principalement à partir d'ARN préparé 42 et 46 heures après l'invasion (figure 4A).

10

La transcription de *Pf-sub2* est régulée d'une manière spécifique de la phase du cycle de *P. falciparum* pour intervenir durant les étapes tardives de la schizogonie de *P. falciparum*, différant par là de l'expression constitutive de *Pf-rab6* (figure 4B).

15

Pour identifier le produit du gène *Pf-sub2*, des analyses de Western Blot et d'immunoprécipitation ont été réalisées en utilisant des extraits protéiques de mérozoïtes et de schizontes segmentés de *P. falciparum*. Comme représenté à la figure 5, les anticorps de souris dirigés contre la protéine de fusion GST-Pf-SUB2 ont permis d'identifier un polypeptide de masse moléculaire apparente de 160 kDa, une masse attendue à partir de la séquence d'acides aminés déduite de *Pf-sub2* (figure 1, couloir 2). Ce polypeptide est uniquement détecté dans des extraits protéiques insolubles dans Na_2CO_3 , ce qui est compatible avec le fait que Pf-SUB2 est une protéine membranaire intégrale. Différents polypeptides plus petits sont également identifiés par analyse par Western Blot, ce qui correspond probablement à des produits de maturation et de dégradation, dans la mesure où seul le plus petit polypeptide membranaire intégral de 65 kDa est détecté par immunoprécipitation d'extraits protéiques de schizontes segmentés et marqués au ^{35}S sur les résidus méthionine/cystéine (figure 5, couloir 5). En outre, l'analyse par Western Blot montre que ce polypeptide de 65 kDa est la seule forme de Pf-SUB2 qui persiste dans les merozoïtes (figure 5, couloir 4). Ainsi, il est probable que le polypeptide de 65 kDa ait la forme finale obtenue à l'issue du procédé de maturation à partir du polypeptide précurseur de 140 kDa

20

25

30

spécifiques des schizontes (figure 5, couloir 2). Par analogie avec les subtilisines bactériennes, le polypeptide de 160 kDa correspondrait à la pro-enzyme inactive et la forme de 65 kDa à la forme active.

Dans le but de localiser la protéine Pf-SUB2, les anticorps dirigés
5 contre la protéine de fusion GST-Pf-SUB2 ont été utilisés par IFA (analyse par immunofluorescence) sur des schizontes segmentés séchés à l'air et produisant un motif ponctiforme (figure 6B) distant du noyau (figure 6A). Des études par immuno-microscopie électronique ont établi que Pf-SUB2 est transportée vers des granules denses à la fois des mérozoïtes en cours de
10 différenciation (schizontes segmentés) et de mérozoïtes libres et des schizontes intraérythrocytaires (figure 6). Dans la mesure où seule la forme de 65 kDa de Pf-SUB2 correspondant vraisemblablement à la forme active de l'enzyme peut être détectée dans les extraits protéiques des mérozoïtes (figure 5, couloir 4), et puisque le contenu des granules denses est sécrété pendant
15 les étapes tardives de l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes, Pf-SUB2 joue vraisemblablement un rôle au cours de l'étape d'invasion biologique essentielle qui initie le cycle asexué intraérythrocytaires de *P. falciparum*.

20 Exemple 3 : Caractérisation du site d'auto-activation prédit de Pf-SUB2

La subtilisine de *B. subtilis* et la protéine kex2 de *S. cerevisiae*, ou de fait la plupart des subtilases connues, éliminent leurs pro-régions par un
25 procédé auto-catalytique. De plus, la séquence du site d'autoactivation mime le site de clivage de leurs substrats spécifiques (Shinde et al, 1995 ; Thomas et al, 1995). En outre, les séquences d'autoactivation sont fréquemment dupliquées dans la même région. Dans la mesure où le site actif de Pf-SUB2 est similaire aux subtilases calcium-dépendantes et du fait de sa localisation à
30 l'intérieur des organelles sécrétoires des mérozoïtes, Pf-SUB2 est un bon candidat pour être la maturase de MSP1-42. Le site d'autoactivation de Pf-SUB2 est vraisemblablement localisé entre les résidus 680 et 720 pour produire le polypeptide de 65 kDa observé dans les extraits de mérozoïtes

(figure 5, couloir 4). Ceci placerait le site d'autoactivation environ 50 résidus avant le résidu Asp⁷⁵⁰ (figure 1), une distance typique pour les subtilases (Siezen et al, 1997). Les inventeurs ont pour cela aligné les 22 résidus entourant le site de maturation de MSP1-42 conservé avec la région du site d'autoactivation prédit pour Pf-SUB2, à savoir les résidus 680 à 720 (figure 1) et montré que MSP1-42 est clivé au niveau de la liaison dipeptidique Leu \uparrow Asn qui peut être trouvée en deux exemplaires dans la région du site d'autoactivation de Pf-SUB2 (figures 1 et 7). En outre, ces dipeptides sont localisés dans des régions de charges conservées ou dans des résidus groupés à la fois dans les séquences de MSP1-42 et Pf-SUB2 (figure 7), suggérant que non seulement la séquence du site de clivage est conservée mais également son environnement qui est important en terme de reconnaissance du substrat. La somme des différentes caractéristiques de Pf-SUB2 (stade auquel elle est synthétisée, localisation de la séquence proposée de son site d'autoactivation) conduit les inventeurs à proposer que Pf-SUB2 est responsable de la maturation essentielle de MSP1-42, essentielle pour l'invasion.

REFERENCES

- Aikawa et al (1990) *Adv. Parasitol.* **29**, 151-214.
- Alves de Castro et al (1996) *Mol. biochem. Parasitol.* **80**, 77-88
- 5 - Barale et al (1997) *Mol. Biochem. Parasitol.* **87**, 169-181.
- Blackman et al (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 23398-23409.
- Brooks et al, (1983), *J. Comp. Chem.* **4**, 187-217.
- Chakrabarti et al (1994) *Mol. Biochem. Parasitol.* **66**, 97-104.
- Felsenstein et al (1993), PHYLIP (Phylogeny Inference Package)
- 10 version 3.5c. Distributed by the author. Seattle, Department of Genetics, University of Washington.
- Frangioni et al (1993) *Analyt. Biochem.* **210**, 179-187.
- Hinterberg et al (1994) *Parasitol. Today* **10**, 225.
- Mattei et al (1992) *Gene* **110**, 71-79.
- 15 - Mc Cutchan et al (1984) *Science* **225**, 625-628.
- Nagase et al (1995) *DNA Research* **2**, 37-43.
- Nielsen et al (1997) *Protein Engineering* **10**, 1-6.
- Rawlings et al (1993) *Biochem. J.* **290**, 205-218.
- Rost et al (1996) *Protein Science* **5**, 1704-1718.
- 20 - Sakai et al (1998) *Molecular Cell* **2**, 505-514.
- Seidah et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3388-3393.
- Shaulsky et al (1995) *Genes & Development* **9**, 1111-1122.
- Shinde et al (1995) in *Intramolecular chaperones and protein folding*, eds. Shinde, U. & Inouye, M. (R.G. Landes Company, Austin), pp. 11-34.
- 25 - Siezen et al (1997) *Protein Science* **6**, 501-523.
- Thomas et al (1995) in *Intramolecular chaperones and protein folding*, eds. Shinde, U. & Inouye, M. (R.G. Landes Company, Austin), pp. 157-179.
- Thompson et al (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Trager et al (1976) *Science* **193**, 673-675.

REVENDICATIONS

1. Polypeptide isolé, dénommé Pf-SUB2, ayant une activité de type sérine-protéase calcium-dépendante comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID n° 3 ou la séquence SEQ ID n° 4 ou toute séquence d'acides aminés homologue.

2. Acide nucléique isolé codant pour un polypeptide ayant une activité de type sérine-protéase selon la revendication 1.

3. Acide nucléique selon la revendication 2 comprenant la séquence nucléotidique SEQ ID n° 1 ou la séquence SEQ ID n° 2 ou toute séquence homologue.

4. Vecteur de clonage et/ou d'expression contenant une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 2 ou 3.

5. Cellule hôte transformée par un vecteur selon la revendication 4.

6. Anticorps mono- ou polyclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus à partir d'un polypeptide selon la revendication 1, administré à un animal, et sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon la revendication 1.

7. Procédé de production d'un polypeptide recombinant tel que défini dans la revendication 1, dans lequel on cultive des cellules transformées selon la revendication 5 dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi la séquence SEQ ID n°3 ou n° 4, ou toute séquence homologue et on récupère ledit polypeptide.

8. Oligonucléotide d'au moins 10 nucléotides, avantageusement d'au moins 14 nucléotides, de préférence d'au moins 20 nucléotides et préférentiellement d'au moins 50 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID n° 1 ou de la séquence SEQ ID n° 2, utile comme sonde spécifique du gène *Pf-sub2* de *P. falciparum*.

9. Couple d'oligonucléotides d'au moins 10 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID n° 1 ou de la séquence SEQ ID n° 2 utile comme amorce spécifique pour l'amplification du gène *Pf-sub2* de *P. falciparum*.

5 10. Composition de diagnostic comprenant un oligonucléotide et/ou selon la revendication 8 et/ou un couple d'oligonucléotides selon la revendication 9, un polypeptide selon la revendication 1 ou un anticorps selon la revendication 6.

10 11. Méthode pour le diagnostic *in vitro* d'une infection par *P. falciparum* comprenant la mise en contact d'au moins un anticorps/peptide tels que définis précédemment, contenus dans un prélèvement biologique d'un hôte infesté par *P. falciparum* dans des conditions permettant la formation éventuelle de complexes immunologiques spécifiques entre une séquence peptidique de Pf-SUB2/anticorps tels que définis précédemment et le ou lesdits
15 anticorps/peptides et la détection des complexes immunologiques spécifiques éventuellement formés.

12. Kit pour le diagnostic *in vitro* d'une infection par *P. falciparum* dans un prélèvement biologique comprenant :

20 - au moins un anticorps/séquence peptidique spécifique de Pf-SUB2, éventuellement fixé sur un support ;

- des moyens de révélation de la formation de complexes antigènes/anticorps spécifiques entre ladite séquence peptidique et ledit anticorps et/ou des moyens de quantification de ces complexes

25 13. Procédé de criblage de l'activité protéase recombinante ou purifiée à partir d'une culture de Pf-SUB2, dans lequel on met en contact un milieu de culture susceptible de contenir Pf-SUB2 avec le substrat de Pf-SUB2, et on détermine l'activité enzymatique résultante.

30 14. Procédé de criblage selon la revendication 13 de composés ayant une affinité pour le polypeptide selon la revendication 1, dans lequel on met en contact lesdits composés avec ledit polypeptide et on évalue le taux d'affinité entre lesdits composés et ledit polypeptide.

15. Procédé de criblage de composés inhibiteurs dudit polypeptide selon la revendication 1, dans lequel on met en contact ledit polypeptide avec lesdits composés potentiellement inhibiteurs en présence d'un substrat dudit polypeptide et on évalue le taux d'inhibition dudit polypeptide par lesdits composés potentiellement inhibiteurs.

16. Utilisation d'un polypeptide à activité de type sérine-protéase selon la revendication 1 pour le criblage de molécules utiles pour la fabrication de médicament destiné à prévenir et/ou traiter une infection à *Plasmodium falciparum*.

17. Composés obtenus par le procédé de criblage selon la revendication 14, plus particulièrement composés obtenus selon le procédé de criblage selon la revendication 15.

18. Composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique selon la revendication 2 ou la revendication 3 ou un oligonucléotide antisens capable de s'hybrider avec la séquence nucléotidique selon la revendication 2 ou la revendication 3 et d'inhiber la transcription ou la traduction du polypeptide Pf-SUB2.

19. Composition pharmaceutique comprenant un composé obtenu par un procédé selon la revendication 14 ou la revendication 15.

20. Composition pharmaceutique comportant un anticorps selon la revendication 6.

21. Composition vaccinale contre une infection à *Plasmodium falciparum* comprenant à titre d'antigène tout ou partie du polypeptide selon la revendication 1 ou tout ou partie de l'acide nucléique selon la revendication 2 ou la revendication 3, susceptible de produire des anticorps neutralisants.

LISTE DE SEQUENCES

<110> Institut Pasteur
CNRS

<120> Nouveau polypeptide à activité de type sérine-protéase
produit par *P. falciparum*

<130> BFF99/0082

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4468

<212> DNA

<213> *Plasmodium falciparum*

<400> 1

```
cacgaggtct cgaggtttttt tttttttttt ttgttatttt tttttttctc tttccgtata 60
atgctgaata ttatttatgt ggtttccttg atattaataa aatttatctt ttataaggaa 120
tgtaataata ataataataa ttatttaagt aatatagaat tatataatta taaactaagg 180
aagagaaaaca ggattctaaa taataatata aatgatagga aatccttttt gtctgattta 240
gaacaaaatt acaaaccatt atttgacata tatgagttat cagctaattt tgagaaaaga 300
agaaaagagt tagagaaaaa aacaaaggga gaagaaaatg aaatagaaaa aaaaaaggaa 360
aatgatttag aaaaaaaaaa agaaaatgat ttagaaaaag aatataatga tgtcataaat 420
ttattagaat taagtttaag ttctgaatat aaggaactaa atgccgatgt aagtaataat 480
gataattctg gacatgagga aaataataaa cacaaattaa ataaaaaaaa ttcttcaaat 540
tataaaaatg ataaatctct tgatgaatta attaaaggcg caatacttaa attgaaacag 600
aatccaaata taaaaaataa aaatatgttg gattatgata aaatatTTaa aataattaaa 660
gaaaaattaa tcaataagaa tttggctagt aacaaaataa gggggggtga taatgaaaaa 720
ttaaaagagg aaaaaaaaca aagcgatata tcaacaaatg tagaagtcaa aaaagatc 780
ataaatgac aactaaataa aggtatacct acaaagaaag aaaataaaga tgatagtata 840
aataaagaaa gtaataagga ggatattact aatgaaggaa aatcgaattc tcttaataat 900
ttgaatacat taaataatga tggaaacata ataacaaaag tatatgacca ctatactata 960
gtaaccaatt ctaacgatat attaaatgat atttctattg atgcctcaga tatatcaaaa 1020
aatagtatag gaggtattaa tatacctttt aatgaaaaag ataatatgtag ttttactcat 1080
cagagatata tagtactatc aaacaatgga gaaaaaaaat acaaaatagt tttaatgaca 1140
aagaatccta aatttatgga tatggatggg aagaagaaaa aagaagaaatc 1200
cttattgaat taaatcaaaa ggtaaacaag gaggaataa caaaccttta tgatggaaacg 1260
gggacattat attatggtaa aaaatccaaa aaggaaaaag aaaatacaca aaaaaaggaa 1320
ggaaataatc caaatgtaga cataaacata ctcaacaata ataataataa taataataat 1380
aataacaata ataataatag taataataat agtaatagta tgaatgacga agaaatcaat 1440
tataataata ataataataa taaagaatca ccaagtatgt tcagacgttt tataaacttt 1500
ttaagtttct caggtaatga aaatgaaaca gaagatactt taatttatca taataaaaaa 1560
gataattcct acaaaaaataa aaaagaagga actggtaaaa ataatgataa taatgatcct 1620
aataataata ataataaaaa aattttgtta aatgttgata aacttgtaga tcaatatcta 1680
ttaaacttaa aaaataatca cacatcgaaa caggaattga tacttgact taaaggagaa 1740
ttagatcttc attcgaaaaa tatgaaaaat gttacaaata atgcaaagaa aaatttagaa 1800
aaatatttta aagaacactt taaggaaattc gataaaatat catatgatat atcaacaccc 1860
attaattttc ttgtattttt tataccaact gtttttgata tgaataatat ggatttactt 1920
aaacaagcac tattaatatt acatagtgat ctacacgaat atgttgaaaa ttggagtttt 1980
tctagtagat accatacata cgaagcggat tatataaagg aacaagattc tgtgtatgat 2040
agatctccaa agaaaaaata tataaaaggcg agtaaaaaat tatataacaa caaatattct 2100
tttttaaata aattctttaa tattgaacca cttatattat ttgctaaaaa gttaaattca 2160
aaacgttcaa atattgagaa agaaatttta aattttttac ctaaggaatt aagagattat 2220
tccacatgga atttgtcaat tattagagtg ttcaatgcgt ggtttctggc tggatatggg 2280
```

```

aataagaatg taaaggtatg tgttgttgat tcagggggcag atataaatcg tgttgattta 2340
aatggtaatt tatatatacc agaataataat gaaaaaatatg aaatgactca agatttttat 2400
aacttcacatg ttaaaaaatc ctacagatgc ttaggtcatg gatcacatgt cactgggtatt 2460
ataggaggtg tagctaataa ttttaggtgta gtaggtgtag ctccataatat tacattaata 2520
tcattaagat ttattgatgg aaaaaaatat ggtggaagtt ttcattgctat taaggcttta 2580
aatgtatgta tattaataaa agcaccaatt ataaatgcta gttggggctc tagtcatttt 2640
gacgttaatt tacatctgac tgtggagaga ttaaaatata cattaaatgg aaaggggagt 2700
gtgttaatat cagcatccgg aaataaaagt aacgataatg atatttcacc tttataacct 2760
gcaacattta catttcctca tgtttatagt gtggcctcca ttagcagaaa ttttgaaatt 2820
tctccgttct caaattatgg atataagagt gtgcacattt tagccccagg tcatcacata 2880
tattctacta ttccaaataa ctcatacaag atctttacag gtacttctat ggctgctcct 2940
catgtatgtg gtgtgagtg tttggtatat tccgtttgtt ataaccaagg ttttattcct 3000
caagcggaag aggtgttaga tatattaaca aggacatcta taaaaataat ttctacaaag 3060
aaaagaacca taaatgacag tttagttaat gcagaaggag cagttttgac tactttatta 3120
ggaggactat ggatgcaaat ggattgttat tttgttaaat ttaattttaga aaaaggcaag 3180
aaaaagcata ttctgttgt tttctcggct tacaagaaag gagtatatga aacagatatc 3240
gttatagcta ttatacctat tgatgggaaa tccaaaatat atggagaaat tcatattcct 3300
ataaaaaattg taaccgatgt aaatatctcc aatttccaag aatctccacg aagaggaaaa 3360
aattatacta tagattctaa tgaagcacia catgatgaag tcctttctta tatctgtgaa 3420
aatgccttat ataatttgta tgaatatgat agtcattatt tgttggcttc tgtcatatta 3480
ttttttctag cattattatc catatttggt ggaatgatat atatgaagtc gcgtaaacad 3540
agtataaga aatgttctaa aaatcttatc aaaagtaatt atataccaga aatggatgat 3600
ggtatggaag aaacacaaca actgcaacaa gaaagaagac aatatttcag agaattattt 3660
ggagaaaaatt tggaaaaagaa ttacgatcag cattttgtac aagatttttg tcaagatttt 3720
agacaagatt tcaagctggg ttcaacacca gacttaaaac aatattctga tatagattta 3780
caaaataaga tacagcaacc ggaaaggaaa accgtaaaaga taattattaa taactttgaa 3840
gatagaaaga aagagaccat aagaagacta ctcaagggat taaattatga tggagaaaaat 3900
gcaagaaac atgatttcac gaatgaaagt attagcaata gtaggaaaaa ttttaaatc 3960
tcaacaata cagaaatgaa aaaaaatact ataaaaagtg aggacgtcaa aatagcatct 4020
gacgataatg ttaataaagc aatgaatcaa cttgatgata tgtttatgaa atgatata 4080
aaaaatatat aacactttca gttttatata cctttttgga atatataat atatatattt 4140
tcatatttat ttattagtaa ataataaaat taccctttta tttttttaa tattttcttt 4200
gttataaaat atcatatata tttttttaat tcttatgtag cctatttatt atatatatat 4260
atatatatat aatatatata tatatatata tatatattta tgtatatattt atttttta 4320
agtactcatt ttttatgtga aaacacatta tctcttttt tctgtttttc attttatttt 4380
attttattta tttattcatt tttttttttt ggtatacata atagctttta ttagttccat 4440
aaatagtgtt aaaaaaaaaa aaaaaaaa 4468

```

<210> 2

<211> 4611

<212> DNA

<213> Plasmodium falciparum

<400> 2

```

cacgaggctc cgagtttttt tttttttttt ttgttatttt tttttttctc tttccgtata 60
atgctgaata ttatttatgt ggtttccttg atattaataa aatttatctt ttataaggaa 120
tgtaataata ataataataa ttatttaagt aatatagaat tatataatta taaactaagg 180
aagagaaaca ggattctaaa taataatata aatgatagga aatccttttt gtctgattta 240
gaacaaaatt acaaacatt atttgacata tatgagttat cagctaattt tgagaaaaga 300
agaaaagagt tagagaaaaa acaaaaggga gaagaaaatg aaatagaaaa aaaaaaggaa 360
aatgatttag aaaaaaaaaa agaaaatgat ttagaaaaag aatataatga tgtcataaat 420
ttattagaat taagtttaag ttctgaatat aaggaaacta atgccgatgt aagtaataat 480
gataattctg gacatgagga aaataataaa cacaatttaa ataaaaaaa ttcttcaaat 540
tataaaaatg ataaatctct tgatgaatta attaaaggcg caatacttaa attgaaacag 600
aatccaaata taaaaaataa aaatatgttg gattatgata aaatatttta aataattaaa 660
gaaaaattaa tcaataagaa tttggctagt aacaaaataa ggggggggtg taatgaaaaa 720
ttaaagaggg aaaaaaaaca aagcgatata tcaacaaatg tagaagtcaa aaaagatatc 780
ataaatgatc aactaaataa aggtatacct acaaagaaag aaaataaaga tgatatgata 840
aataaagaaa gtaataagga ggatattact aatgaaggaa aatcgaattc tcttaataat 900
ttgaatacat taaataatga tggaaacata ataacaaaag tatatgacca ctatactata 960
gtaaccaatt ctaacgatat attaaatgat atttctattg atgcctcaga tatatcaaaa 1020

```

```

aatagtatat gaggtattaa tatacctttt aatgaaaacg ataatagtag ttttactcat 1080
cagagatata tagtactatc aaacaatgga gaaaaaaaat acaaaatagt tttaatgaca 1140
aagaatccta aattttatgga tatggatggt atatatgatg aagaagaaaa aaaagaatct 1200
cttattgaat taaatcaaaa ggtaaacaaag gaggaaaaata caaaccttta tgatggaacg 1260
gggacattat attatggtaa aaaatccaaa aaggaaaaag aaaatacaca acaaaaagga 1320
ggaaataatc caaatgtaga cataaacata ctcaacaata ataataataa taataataat 1380
aataacaata ataataatag taataataat agtaatagta tgaatgacga agaaatcaat 1440
tataataata ataataataa taaagaatca ccaagtatgt tcagacgttt tataaacttt 1500
ttaagtttct caggtaatga aaatgaaaca gaagatactt taatttatca taataaaaat 1560
gataattcct acaaaaataa aaaagaagga actggtaaaa ataatgataa taatgatcct 1620
aataataata ataataaaaa aattttgtta aatggtgata aacttgtaga tcaatatcta 1680
ttaaacttaa aaaataatca cacatcgaaa caggaattga tacttgtaga taaaggagaa 1740
ttagatcttc attcgaaaaa tatgaaaaat gttacaaata atgcaaagaa aaatttagaa 1800
aaatatttta aagaacactt taaggaattc gataaaatat catatgatat atcaacaccc 1860
attaattttc tttgtatttt tataccaact gtttttgata tgaataatat ggatttactt 1920
aaacaagcac tattaatatt acatagtgat ctacacgaat atgttgaaaa ttggagtttt 1980
tctagtacat accatacata cgaagcggat tatataaagg aacaagattc tgtgtatgat 2040
agatctccaa agaaaaataa tataaaagcg agtaaaaaat tatataacaa caaatattct 2100
tttttaaaata aattcttaaa tattgaacca cttatattat ttgctaaaaa gttaaattca 2160
aaacgttcaa atattgagaa agaaaatttta aattttttac ctaaggaatt aagagattat 2220
tccacatgga atttgtcaat tattagagtg ttcaatgcgt ggtttctggc tggatatggg 2280
aataagaatg taaaggtagt tgttgttgat tcaggggcag atataaatcg tgttgattta 2340
aatggtaatt tatatatacc agaataatag gaaaaaatat aaatgactca agatttttat 2400
aacttcatgg ttaaaaaatc ctacagatgc ttaggtcatg gatcacatgt cactgggtatt 2460
ataggagggt tagctaataa tttaggtgta gtaggtgtag ctccataat taacattaata 2520
tcattaagat ttatttgatg aaaaaaatat ggtggaagtt ttcatgctat taaggcttta 2580
aatgtatgta tattaaataa agcaccaatt ataaatgcta gttggggctc tagtcatttt 2640
gacgttaatt tacatctgac tgtggagaga ttaaaatata cattaaatgg aaaggggagt 2700
gtgttaatat cagcatccgg aaataaaagt aacgataatg atatttcacc tttataacct 2760
gcaacattta catctcctca tgtttatagg taatacagaa tatgtataaa atatatgcaa 2820
gttggaaatg aattaatatg tatatatgga tatatatatg tatatatata 2880
tatatgttta ttttttttat tttttatttt ttatttttat tcttttttgt agtgtggcct 2940
ccattagcag aaattttgaa atttctcctt tctcaaatta tggatataag agtgtgcaca 3000
ttttagcccc aggtcatcac atatatctta ctattccaaa taactcatal aagatcttta 3060
caggtacttc tatggctgct cctcatgtat gtgggtgtag tgctttggta tattccgttt 3120
gttataacca aggtttttat cctcaagcgg aagaggtggt agatatatta acaaggacat 3180
ctataaaaaa aatttctaca aagaaaagaa ccataaatga cagtttagtt aatgcagaag 3240
gagcagtttt gactacttta ttaggaggac tatggatgca aatggattgt tattttgtta 3300
aatttaattt agaaaaaggc aagaaaaagc atattcctgt tgttttctcg gcttacaaga 3360
aaggagtata tgaacagat atcgttatag ctattatacc tattgatggg aaatccaaaa 3420
tatatggaga aattcatatt cctataaaaa ttgtaaccga tgtaaattat cccaatttcc 3480
aagaatctcc acgaagagga aaaaattata ctatagattc taatgaagca caacatgatg 3540
aagtcctttc ttatatctgt gaaaatgcct tatataattt gtatgaatat gatagtcatt 3600
atttgttggc ttctgtcata ttattttttc tagcattatt atccatattt gttggaatga 3660
tatatatgaa gtcgcgtaaa catagtgata agaaatgttc taaaaatcct atcaaaagta 3720
attatatacc agaaatggat gatggtatgg aagaaacaca acaactgcaa caagaaagaa 3780
gacaatatat cagagaatta tttggagaaa atttggaaaa gaattacgat cagcattttg 3840
tacaagattt tggccaagat tttagacaag atttcaagct gggttcaaca ccagacttaa 3900
aacaatatat tgatatagat ttacaaaata agatacagca accggaaagg aaaaccgtaa 3960
agataaattat taataacttt gaagatagaa agaaagagac cataagaaga ctactcaagg 4020
gattaaatta tgatggagaa aatgcaaaga aacatgattt cacgaatgaa agtattagca 4080
atagtaggaa aaattttaaa ttctcaaaca atacagaaat gaaaaaaaat actataaaaa 4140
gtgaggacgt caaaatagca tctgacgata atgttaataa agcaatgaat caacttgatg 4200
atatgtttat gaaatgatat ataaaaata tatttattag taataataaa aattaccctt 4320
ggaatatata tatatatata ttttcatatt aatatcatat atattttttt aatttttatg 4380
ttattttttt aaatatattt tttgttataa aataatcatat atatatatat atatatatat 4440
tagcctattt attatatata tatatatata taaaatgatg tgaaaacaca ttatcctctt 4500
ttatgtatat tttatttttt aatagtactc attttttatg tttttttttt tttgggtatac 4560
ttttctgttt ttcattttat tttattttat ttattttatt attttttttt tttgggtatac 4611
ataatagctt ttattagttc cataaatagt gttaaaaaaa aaaaaaaa a

```

<210> 3

<211> 1337

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 3

```

Met Leu Asn Ile Ile Tyr Val Val Ser Leu Ile Leu Ile Lys Phe Ile
 1           5           10           15

Phe Tyr Lys Glu Cys Asn Asn Asn Asn Asn Tyr Leu Ser Asn Ile
          20           25           30

Glu Leu Tyr Asn Tyr Lys Leu Arg Lys Arg Asn Arg Ile Leu Asn Asn
          35           40           45

Asn Ile Asn Asp Arg Lys Ser Phe Leu Ser Asp Leu Glu Gln Asn Tyr
          50           55           60

Lys Pro Leu Phe Asp Ile Tyr Glu Leu Ser Ala Asn Phe Glu Lys Arg
          65           70           75           80

Arg Lys Glu Leu Glu Lys Lys Thr Lys Gly Glu Glu Asn Glu Ile Glu
          85           90           95

Lys Lys Lys Glu Asn Asp Leu Glu Lys Lys Lys Glu Asn Asp Leu Glu
          100          105          110

Lys Glu Tyr Asn Asp Val Ile Asn Leu Leu Glu Leu Ser Leu Ser Ser
          115          120          125

Glu Tyr Lys Glu Leu Asn Ala Asp Val Ser Asn Asn Asp Asn Ser Gly
          130          135          140

His Glu Glu Asn Asn Lys His Lys Leu Asn Lys Lys Asn Ser Ser Asn
          145          150          155          160

Tyr Lys Asn Asp Lys Ser Leu Asp Glu Leu Ile Lys Gly Ala Ile Leu
          165          170          175

Lys Leu Lys Gln Asn Pro Asn Ile Lys Asn Lys Asn Met Leu Asp Tyr
          180          185          190

Asp Lys Ile Phe Lys Ile Ile Lys Glu Lys Leu Ile Asn Lys Asn Leu
          195          200          205

Ala Ser Asn Lys Ile Arg Gly Gly Asp Asn Glu Lys Leu Lys Glu Glu
          210          215          220

Lys Lys Gln Ser Asp Ile Ser Thr Asn Val Glu Val Lys Lys Asp Ile
          225          230          235          240

Ile Asn Asp Gln Leu Asn Lys Gly Ile Pro Thr Lys Lys Glu Asn Lys
          245          250          255

Asp Asp Met Ile Asn Lys Glu Ser Asn Lys Glu Asp Ile Thr Asn Glu
          260          265          270

Gly Lys Ser Asn Ser Leu Asn Asn Leu Asn Thr Leu Asn Asn Asp Gly
          275          280          285

Asn Ile Ile Thr Lys Val Tyr Asp His Tyr Thr Ile Val Thr Asn Ser

```

290	295	300
Asn Asp Ile Leu Asn Asp Ile Ser Ile Asp Ala Ser Asp Ile Ser Lys 305 310 315 320		
Asn Ser Ile Gly Gly Ile Asn Ile Pro Phe Asn Glu Asn Asp Asn Ser 325 330 335		
Ser Phe Thr His Gln Arg Tyr Ile Val Leu Ser Asn Asn Gly Glu Lys 340 345 350		
Lys Tyr Lys Ile Val Leu Met Thr Lys Asn Pro Lys Phe Met Asp Met 355 360 365		
Asp Gly Ile Tyr Asp Glu Glu Glu Lys Lys Glu Ser Leu Ile Glu Leu 370 375 380		
Asn Gln Lys Val Asn Lys Glu Glu Asn Thr Asn Leu Tyr Asp Gly Thr 385 390 395 400		
Gly Thr Leu Tyr Tyr Gly Lys Lys Ser Lys Lys Glu Lys Glu Asn Thr 405 410 415		
Gln Gln Lys Gly Gly Asn Asn Pro Asn Val Asp Ile Asn Ile Leu Asn 420 425 430		
Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ser Asn 435 440 445		
Asn Asn Ser Asn Ser Met Asn Asp Glu Glu Ile Asn Tyr Asn Asn Asn 450 455 460		
Asn Asn Asn Lys Glu Ser Pro Ser Met Phe Arg Arg Phe Ile Asn Phe 465 470 475 480		
Leu Ser Phe Ser Gly Asn Glu Asn Glu Thr Glu Asp Thr Leu Ile Tyr 485 490 495		
His Asn Lys Asn Asp Asn Ser Tyr Lys Asn Lys Lys Glu Gly Thr Gly 500 505 510		
Lys Asn Asn Asp Asn Asn Asp Pro Asn Asn Asn Asn Asn Lys Lys Ile 515 520 525		
Leu Leu Asn Val Asp Lys Leu Val Asp Gln Tyr Leu Leu Asn Leu Lys 530 535 540		
Asn Asn His Thr Ser Lys Gln Glu Leu Ile Leu Val Leu Lys Gly Glu 545 550 555 560		
Leu Asp Leu His Ser Lys Asn Met Lys Asn Val Thr Asn Asn Ala Lys 565 570 575		
Lys Asn Leu Glu Lys Tyr Phe Lys Glu His Phe Lys Glu Phe Asp Lys 580 585 590		
Ile Ser Tyr Asp Ile Ser Thr Pro Ile Asn Phe Leu Cys Ile Phe Ile 595 600 605		
Pro Thr Val Phe Asp Met Asn Asn Met Asp Leu Leu Lys Gln Ala Leu 610 615 620		

Leu Ile Leu His Ser Asp Leu His Glu Tyr Val Glu Asn Trp Ser Phe
 625 630 635 640
 Ser Ser Thr Tyr His Thr Tyr Glu Ala Asp Tyr Ile Lys Glu Gln Asp
 645 650 655
 Ser Val Tyr Asp Arg Ser Pro Lys Lys Lys Tyr Ile Lys Ala Ser Lys
 660 665 670
 Lys Leu Tyr Asn Asn Lys Tyr Ser Phe Leu Asn Lys Phe Leu Asn Ile
 675 680 685
 Glu Pro Leu Ile Leu Phe Ala Lys Lys Leu Asn Ser Lys Arg Ser Asn
 690 695 700
 Ile Glu Lys Glu Ile Leu Asn Phe Leu Pro Lys Glu Leu Arg Asp Tyr
 705 710 715 720
 Ser Thr Trp Asn Leu Ser Ile Ile Arg Val Phe Asn Ala Trp Phe Leu
 725 730 735
 Ala Gly Tyr Gly Asn Lys Asn Val Lys Val Cys Val Val Asp Ser Gly
 740 745 750
 Ala Asp Ile Asn Arg Val Asp Leu Asn Gly Asn Leu Tyr Ile Pro Glu
 755 760 765
 Tyr Asn Glu Lys Tyr Glu Met Thr Gln Asp Phe Tyr Asn Phe Met Val
 770 775 780
 Lys Lys Ser Tyr Arg Cys Leu Gly His Gly Ser His Val Thr Gly Ile
 785 790 795 800
 Ile Gly Gly Val Ala Asn Asp Leu Gly Val Val Gly Val Ala Pro Asn
 805 810 815
 Ile Thr Leu Ile Ser Leu Arg Phe Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Gly Gly
 820 825 830
 Ser Phe His Ala Ile Lys Ala Leu Asn Val Cys Ile Leu Asn Lys Ala
 835 840 845
 Pro Ile Ile Asn Ala Ser Trp Gly Ser Ser His Phe Asp Val Asn Leu
 850 855 860
 His Leu Thr Val Glu Arg Leu Lys Tyr Thr Leu Asn Gly Lys Gly Ser
 865 870 875 880
 Val Leu Ile Ala Ala Ser Gly Asn Lys Ser Asn Asp Asn Asp Ile Ser
 885 890 895
 Pro Leu Tyr Pro Ala Thr Phe Thr Phe Pro His Val Tyr Ser Val Ala
 900 905 910
 Ser Ile Ser Arg Asn Phe Glu Ile Ser Pro Phe Ser Asn Tyr Gly Tyr
 915 920 925
 Lys Ser Val His Ile Leu Ala Pro Gly His His Ile Tyr Ser Thr Ile
 930 935 940

Pro Asn Asn Ser Tyr Lys Ile Phe Thr Gly Thr Ser Met Ala Ala Pro
 945 950 955 960
 His Val Cys Gly Val Ser Ala Leu Val Tyr Ser Val Cys Tyr Asn Gln
 965 970 975
 Gly Phe Ile Pro Gln Ala Glu Glu Val Leu Asp Ile Leu Thr Arg Thr
 980 985 990
 Ser Ile Lys Ile Ile Ser Thr Lys Lys Arg Thr Ile Asn Asp Ser Leu
 995 1000 1005
 Val Asn Ala Glu Gly Ala Val Leu Thr Thr Leu Leu Gly Gly Leu Trp
 1010 1015 1020
 Met Gln Met Asp Cys Tyr Phe Val Lys Phe Asn Leu Glu Lys Gly Lys
 1025 1030 1035 1040
 Lys Lys His Ile Pro Val Val Phe Ser Ala Tyr Lys Lys Gly Val Tyr
 1045 1050 1055
 Glu Thr Asp Ile Val Ile Ala Ile Ile Pro Ile Asp Gly Lys Ser Lys
 1060 1065 1070
 Ile Tyr Gly Glu Ile His Ile Pro Ile Lys Ile Val Thr Asp Val Asn
 1075 1080 1085
 Ile Pro Asn Phe Gln Glu Ser Pro Arg Arg Gly Lys Asn Tyr Thr Ile
 1090 1095 1100
 Asp Ser Asn Glu Ala Gln His Asp Glu Val Leu Ser Tyr Ile Cys Glu
 1105 1110 1115 1120
 Asn Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Glu Tyr Asp Ser His Tyr Leu Leu Ala
 1125 1130 1135
 Ser Val Ile Leu Phe Phe Leu Ala Leu Leu Ser Ile Phe Val Gly Met
 1140 1145 1150
 Ile Tyr Met Lys Ser Arg Lys His Ser Asp Lys Lys Cys Ser Lys Asn
 1155 1160 1165
 Leu Ile Lys Ser Asn Tyr Ile Pro Glu Met Asp Asp Gly Met Glu Glu
 1170 1175 1180
 Thr Gln Gln Leu Gln Gln Glu Arg Arg Gln Tyr Phe Arg Glu Leu Phe
 1185 1190 1195 1200
 Gly Glu Asn Leu Glu Lys Asn Tyr Asp Gln His Phe Val Gln Asp Phe
 1205 1210 1215
 Gly Gln Asp Phe Arg Gln Asp Phe Lys Leu Gly Ser Thr Pro Asp Leu
 1220 1225 1230
 Lys Gln Tyr Ser Asp Ile Asp Leu Gln Asn Lys Ile Gln Gln Pro Glu
 1235 1240 1245
 Arg Lys Thr Val Lys Ile Ile Ile Asn Asn Phe Glu Asp Arg Lys Lys
 1250 1255 1260
 Glu Thr Ile Arg Arg Leu Leu Lys Gly Leu Asn Tyr Asp Gly Glu Asn

BNSBGGID: «ГП_2701005A1_1_»

210	215	220
Asn Lys Gly Ile Pro Thr Lys Lys Glu Asn Lys Asp Asp Met Ile Asn 225 230 235 240		
Lys Glu Ser Asn Lys Glu Asp Ile Thr Asn Glu Gly Lys Ser Asn Ser 245 250 255		
Leu Asn Asn Leu Asn Thr Leu Asn Asn Asp Gly Asn Ile Ile Thr Lys 260 265 270		
Val Tyr Asp His Tyr Thr Ile Val Thr Asn Ser Asn Asp Ile Leu Asn 275 280 285		
Asp Ile Ser Ile Asp Ala Ser Asp Ile Ser Lys Asn Ser Ile Gly Gly 290 295 300		
Ile Asn Ile Pro Phe Asn Glu Asn Asp Asn Ser Ser Phe Thr His Gln 305 310 315 320		
Arg Tyr Ile Val Leu Ser Asn Asn Gly Glu Lys Lys Tyr Lys Ile Val 325 330 335		
Leu Met Thr Lys Asn Pro Lys Phe Met Asp Met Asp Gly Ile Tyr Asp 340 345 350		
Glu Glu Glu Lys Lys Glu Ser Leu Ile Glu Leu Asn Gln Lys Val Asn 355 360 365		
Lys Glu Glu Asn Thr Asn Leu Tyr Asp Gly Thr Gly Thr Leu Tyr Tyr 370 375 380		
Gly Lys Lys Ser Lys Lys Glu Lys Glu Asn Thr Gln Gln Lys Gly Gly 385 390 395 400		
Asn Asn Pro Asn Val Asp Ile Asn Ile Leu Asn Asn Asn Asn Asn Asn 405 410 415		
Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ser Asn Asn Asn Ser Asn Ser 420 425 430		
Met Asn Asp Glu Glu Ile Asn Tyr Asn Asn Asn Asn Asn Lys Glu 435 440 445		
Ser Pro Ser Met Phe Arg Arg Phe Ile Asn Phe Leu Ser Phe Ser Gly 450 455 460		
Asn Glu Asn Glu Thr Glu Asp Thr Leu Ile Tyr His Asn Lys Asn Asp 465 470 475 480		
Asn Ser Tyr Lys Asn Lys Lys Glu Gly Thr Gly Lys Asn Asn Asp Asn 485 490 495		
Asn Asp Pro Asn Asn Asn Asn Lys Lys Ile Leu Leu Asn Val Asp 500 505 510		
Lys Leu Val Asp Gln Tyr Leu Leu Asn Leu Lys Asn Asn His Thr Ser 515 520 525		
Lys Gln Glu Leu Ile Leu Val Leu Lys Gly Glu Leu Asp Leu His Ser 530 535 540		

Lys Asn Met Lys Asn Val Thr Asn Asn Ala Lys Lys Asn Leu Glu Lys
 545 550 555 560
 Tyr Phe Lys Glu His Phe Lys Glu Phe Asp Lys Ile Ser Tyr Asp Ile
 565 570 575
 Ser Thr Pro Ile Asn Phe Leu Cys Ile Phe Ile Pro Thr Val Phe Asp
 580 585 590
 Met Asn Asn Met Asp Leu Leu Lys Gln Ala Leu Leu Ile Leu His Ser
 595 600 605
 Asp Leu His Glu Tyr Val Glu Asn Trp Ser Phe Ser Ser Thr Tyr His
 610 615 620
 Thr Tyr Glu Ala Asp Tyr Ile Lys Glu Gln Asp Ser Val Tyr Asp Arg
 625 630 635 640
 Ser Pro Lys Lys Lys Tyr Ile Lys Ala Ser Lys Lys Leu Tyr Asn Asn
 645 650 655
 Lys Tyr Ser Phe Leu Asn Lys Phe Leu Asn Ile Glu Pro Leu Ile Leu
 660 665 670
 Phe Ala Lys Lys Leu Asn Ser Lys Arg Ser Asn Ile Glu Lys Glu Ile
 675 680 685
 Leu Asn Phe Leu Pro Lys Glu Leu Arg Asp Tyr Ser Thr Trp Asn Leu
 690 695 700
 Ser Ile Ile Arg Val Phe Asn Ala Trp Phe Leu Ala Gly Tyr Gly Asn
 705 710 715 720
 Lys Asn Val Lys Val Cys Val Val Asp Ser Gly Ala Asp Ile Asn Arg
 725 730 735
 Val Asp Leu Asn Gly Asn Leu Tyr Ile Pro Glu Tyr Asn Glu Lys Tyr
 740 745 750
 Glu Met Thr Gln Asp Phe Tyr Asn Phe Met Val Lys Lys Ser Tyr Arg
 755 760 765
 Cys Leu Gly His Gly Ser His Val Thr Gly Ile Ile Gly Gly Val Ala
 770 775 780
 Asn Asp Leu Gly Val Val Gly Val Ala Pro Asn Ile Thr Leu Ile Ser
 785 790 795 800
 Leu Arg Phe Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Gly Gly Ser Phe His Ala Ile
 805 810 815
 Lys Ala Leu Asn Val Cys Ile Leu Asn Lys Ala Pro Ile Ile Asn Ala
 820 825 830
 Ser Trp Gly Ser Ser His Phe Asp Val Asn Leu His Leu Thr Val Glu
 835 840 845
 Arg Leu Lys Tyr Thr Leu Asn Gly Lys Gly Ser Val Leu Ile Ala Ala
 850 855 860

Ser Gly Asn Lys Ser Asn Asp Asn Asp Ile Ser Pro Leu Tyr Pro Ala
 865 870 875 880
 Thr Phe Thr Phe Pro His Val Tyr Ser Val Ala Ser Ile Ser Arg Asn
 885 890 895
 Phe Glu Ile Ser Pro Phe Ser Asn Tyr Gly Tyr Lys Ser Val His Ile
 900 905 910
 Leu Ala Pro Gly His His Ile Tyr Ser Thr Ile Pro Asn Asn Ser Tyr
 915 920 925
 Lys Ile Phe Thr Gly Thr Ser Met Ala Ala Pro His Val Cys Gly Val
 930 935 940
 Ser Ala Leu Val Tyr Ser Val Cys Tyr Asn Gln Gly Phe Ile Pro Gln
 945 950 955 960
 Ala Glu Glu Val Leu Asp Ile Leu Thr Arg Thr Ser Ile Lys Ile Ile
 965 970 975
 Ser Thr Lys Lys Arg Thr Ile Asn Asp Ser Leu Val Asn Ala Glu Gly
 980 985 990
 Ala Val Leu Thr Thr Leu Leu Gly Gly Leu Trp Met Gln Met Asp Cys
 995 1000 1005
 Tyr Phe Val Lys Phe Asn Leu Glu Lys Gly Lys Lys Lys His Ile Pro
 1010 1015 1020
 Val Val Phe Ser Ala Tyr Lys Lys Gly Val Tyr Glu Thr Asp Ile Val
 1025 1030 1035 1040
 Ile Ala Ile Ile Pro Ile Asp Gly Lys Ser Lys Ile Tyr Gly Glu Ile
 1045 1050 1055
 His Ile Pro Ile Lys Ile Val Thr Asp Val Asn Ile Pro Asn Phe Gln
 1060 1065 1070
 Glu Ser Pro Arg Arg Gly Lys Asn Tyr Thr Ile Asp Ser Asn Glu Ala
 1075 1080 1085
 Gln His Asp Glu Val Leu Ser Tyr Ile Cys Glu Asn Ala Leu Tyr Asn
 1090 1095 1100
 Leu Tyr Glu Tyr Asp Ser His Tyr Leu Leu Ala Ser Val Ile Leu Phe
 1105 1110 1115 1120
 Phe Leu Ala Leu Leu Ser Ile Phe Val Gly Met Ile Tyr Met Lys Ser
 1125 1130 1135
 Arg Lys His Ser Asp Lys Lys Cys Ser Lys Asn Leu Ile Lys Ser Asn
 1140 1145 1150
 Tyr Ile Pro Glu Met Asp Asp Gly Met Glu Glu Thr Gln Gln Leu Gln
 1155 1160 1165
 Gln Glu Arg Arg Gln Tyr Phe Arg Glu Leu Phe Gly Glu Asn Leu Glu
 1170 1175 1180
 Lys Asn Tyr Asp Gln His Phe Val Gln Asp Phe Gly Gln Asp Phe Arg

1185	1190	1195	1200
Gln Asp Phe Lys Leu Gly Ser Thr Pro Asp Leu Lys Gln Tyr Ser Asp			
1205		1210	1215
Ile Asp Leu Gln Asn Lys Ile Gln Gln Pro Glu Arg Lys Thr Val Lys			
1220		1225	1230
Ile Ile Ile Asn Asn Phe Glu Asp Arg Lys Lys Glu Thr Ile Arg Arg			
1235		1240	1245
Leu Leu Lys Gly Leu Asn Tyr Asp Gly Glu Asn Ala Lys Lys His Asp			
1250		1255	1260
Phe Thr Asn Glu Ser Ile Ser Asn Ser Arg Lys Asn Phe Lys Phe Ser			
1265		1270	1275
			1280
Asn Asn Thr Glu Met Lys Lys Asn Thr Ile Lys Ser Glu Asp Val Lys			
	1285	1290	1295
Ile Ala Ser Asp Asp Asn Val Asn Lys Ala Met Asn Gln Leu Asp Asp			
1300		1305	1310
Met Phe Met Lys			
1315			

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche2791685
N° d'enregistrement
nationalFA 573855
FR 9904039

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,X	BLACKMAN M J ET AL., : "A subtilisin-like protein in secretory organelles of Plasmodium falciparum merozoites." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY , vol. 273 (36), 4 septembre 1998 (1998-09-04), page 23398-23409 XP002123629 * le document en entier *	1-21
A	WO 93 12226 A (MEDICAL RES COUNCIL) 24 juin 1993 (1993-06-24) * le document en entier *	1-21
D,A	BLACKMAN M J ET AL., : "A conserved parasite serine protease processes the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1" MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY , vol. 62 (1), 1993, page 103-114 XP002123630 discussion	1,6, 11-15
A	BLACKMAN M J ET AL: "SECONDARY PROCESSING OF THE PLASMODIUM FALCIPARUM MEROZOITE SURFACE PROTEIN-1 (MSP1) BY A CALCIUM-DEPENDENT MEMBRANE-BOUND SERINE PROTEASE: SHEDDING OF MSP133 AS A NONCOVALENTLY ASSOCIATED COMPLEX WITH OTHER FRAGMENTS OF THE MSP1" MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 50, no. 2, 1992, page 307-315 XP000603761 ISSN: 0166-6851 * le document en entier *	1,6, 11-15
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
23 novembre 1999		Mateo Rosell, A.M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 03.92 (P04C13)

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2791685

N° d'enregistrement
nationalFA 573855
FR 9904039

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,A	SEIDAH N ET AL., : "Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization." PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A., vol. 96 (4), 16 février 1999 (1999-02-16), page 1321-1326 XP002123631 discussion	1-9
D,A	SHAULSKY G ET AL., : "A multidrug resistance transporter/serine protease gene is required for prestalk specialization in Dictyoselium" GENES AND DEVELOPMENT, vol. 9, no. 9, 1995, pages 1111-1122, XP002123632 * abrégé * * page 1116, colonne de gauche, dernier alinéa - page 1117, colonne de droite, alinéa 1; figure 6 *	1-9
D,A	SAKAI J ET AL., : "Molecular identification of the sterol-regulated luminal proteases that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells" MOLECULAR CELL, vol. 2, octobre 1998 (1998-10), pages 505-514, XP002123633 discussion	1-9
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
23 novembre 1999		Mateo Rosell, A.M.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche2791685
N° d'enregistrement
nationalFA 573855
FR 9904039

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D, A	SIEZEN R.J. AND LEUNISSEN JAM: "Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases" PROTEIN SCIENCE, vol. 6, no. 3, mars 1997 (1997-03), pages 501-523, XP002123634 * le document en entier *	1
T	BARALE J.C. ET AL., : "Plasmodium falciparum subtilisin-like-protease 2, a merozoite candidate " PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A., vol. 96, mai 1999 (1999-05), page 6445-6450 XP002123635 * le document en entier *	1-21
T	DATABASE EMBL NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES, 1 mai 1999 (1999-05-01), XP002123636 HINXTON, GB AC = 097364. HACKETT F. et al., PfSUB-2: a second subtilisin-like protease in Plasmodium falciparum merozoites. * abrégé *	1-5, 8, 9
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
23 novembre 1999		Mateo Rosell, A.M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1
EPO FORM 1503 03.92 (P04C13)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)